

• 论 著 •

天然水蛭素对人微血管再生作用的初步研究

林冠宇¹, 林博杰¹, 朱江英¹, 潘新元², 殷国前¹

1. 广西医科大学第一附属医院整形美容外科(南宁 530021)

2. 广西壮族自治区民族医院烧伤整形外科(南宁 530001)

【摘要】 目的 研究天然水蛭素对人微血管内皮细胞(human microvascular endothelial cells, HMVECs)增殖的影响及其诱导血管再生的机制。**方法** 取HMVECs接种至Matrigel基质胶培养24 h, 体外建立三维培养模型, 于倒置相差显微镜下观察细胞生长情况。然后将细胞三维培养模型随机分为不同浓度天然水蛭素培养组(1、4、7 ATU/mL组)以及单纯含10%FBS的DMEM培养基培养组(对照组)。各组细胞三维培养模型加入对应培养基后, 培养24、48、72 h采用细胞计数试剂盒8(cell counting kit 8, CCK-8)检测细胞增殖情况; 培养24 h行成管实验并采用免疫荧光染色法测定细胞VEGF及Notch1表达水平。**结果** 细胞三维培养观察示, HMVECs于基质胶上贴附良好, 24 h时完全形成管腔样结构。CCK-8检测示, 各时间点1、4 ATU/mL组A值均高于对照组($P<0.05$), 其中4 ATU/mL组最高; 而7 ATU/mL组A值显著低于对照组以及1、4 ATU/mL组($P<0.05$)。细胞成管实验示, 1、4 ATU/mL组成管数量较对照组及7 ATU/mL组明显增多, 且4 ATU/mL组多于1 ATU/mL组, 差异有统计学意义($P<0.05$); 7 ATU/mL组与对照组比较, 差异无统计学意义($P>0.05$)。免疫荧光染色示, 与对照组比较, 1、4 ATU/mL组Notch1表达量增高, 7 ATU/mL组降低; 其中4、7 ATU/mL组与对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。1、4、7 ATU/mL组VEGF表达量均较对照组增高, 4 ATU/mL组高于1、7 ATU/mL组, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 低、中浓度天然水蛭素可促进HMVECs增殖使血管再生, 高浓度天然水蛭素则对HMVECs增殖及血管再生起抑制作用; 其作用机制可能与VEGF-Notch信号通路有关。

【关键词】 水蛭素; 微血管内皮细胞; 三维培养; Notch信号通路; 血管再生

Effect of natural hirudin on angiogenesis of human microvascular endothelial cells

LIN Guanyu¹, LIN Bojie¹, ZHU Jiangying¹, PAN Xinyuan², YIN Guoqian¹

1. Department of Plastic and Aesthetic Surgery, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning Guangxi, 530021, P.R.China

2. Department of Burn and Plastic Surgery, Minzu Hospital of Zhuang Autonomous Region, Nanning Guangxi, 530001, P.R.China

Corresponding author: YIN Guoqian, Email: yingq61@163.com

【Abstract】 Objective To explore the effect of natural hirudin on proliferation of human microvascular endothelial cells (HMVECs) and its preliminary mechanism of promoting angiogenesis. **Methods** Three-dimensional culture models of HMVECs were established *in vitro* and observed by inverted phase contrast microscopy after 24 hours of culturing. Then, the three-dimensional culture models of HMVECs were treated with different concentrations (1, 4, and 7 ATU/mL) of the natural hirudin, respectively, and Dulbecco's modified Eagle's medium containing 10% fetal bovine serum as control. The cell proliferations of 4 groups were detected by cell counting kit 8 (CCK-8) method at 24, 48, and 72 hours; the angiogenesis of 4 groups were observed by tube formation assay at 24 hours; the expressions of vascular endothelial growth factor (VEGF) and Notch1 of HMVECs in 4 groups were observed by immunofluorescence staining at 24 hours. **Results** The observation of cells in three-dimensional culture models showed that HMVECs attached to Matrigel well, and the cells formed tube structure completely after 24 hours. The results of CCK-8 test showed that the absorbance (A) value of 1 and 4 ATU/mL groups were higher than that of control group at each time point ($P<0.05$), and A value of 4 ATU/mL group was the highest. The A value of 7 ATU/mL group was significantly lower than those of 1 and 4 ATU/mL groups and control group ($P<0.05$). The tube formation assay showed that the tube structure was more in 1 and 4 ATU/mL groups than in 7 ATU/mL group and control group, and in 4 ATU/mL group than in

DOI: 10.7507/1002-1892.201806055

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81460297)

通信作者: 殷国前, Email: yingq61@163.com

1 ATU/mL group, showing significant differences ($P<0.05$). There was no significant difference between 7 ATU/mL group and control group ($P>0.05$). The results of immunofluorescence staining showed that compared with control group, the Notch1 expression was higher in 1 and 4 ATU/mL groups and lower in 7 ATU/mL group; and there was significant difference between 4 and 7 ATU/mL groups and control group ($P<0.05$). The VEGF expression was higher in 1, 4, and 7 ATU/mL groups than in control group, in 4 ATU/mL group than in 1 and 7 ATU/mL groups, showing significant differences ($P<0.05$). **Conclusion** Natural hirudin can promote angiogenesis at low and medium concentrations, but suppress angiogenesis at high concentrations. Its mechanism may be related to the VEGF-Notch signal pathway.

【Key words】 Hirudin; microvascular endothelial cells; three-dimensional culture; Notch signaling pathway; angiogenesis

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (81460297)

天然水蛭素为水蛭的主要成分,临床首先将其用于治疗血栓类疾病。近年来研究发现,天然水蛭素还具有抗炎、改善循环、促进血管生成等作用,进一步扩展了临床应用范围^[1-2]。本课题组研究发现,天然水蛭素能缓解微动脉壁痉挛、扩张血管、加快血液循环,通过刺激内皮细胞释放 VEGF 来促进微血管生成^[3]。有研究者^[4]还发现,天然水蛭素具有促进内皮细胞释放 VEGF 和提高在淤血皮瓣局部起抗炎作用的超氧化物歧化酶含量,且效果优于重组水蛭素。Pan 等^[5]的相关作用机制研究证实,天然水蛭素可通过调节 p38、MAPK 和 ERK 分子的交互作用,促进大鼠缺血皮瓣模型的血管生成。

Notch 信号通路在人血管形成中起重要作用^[6],它有 4 个受体 (Notch1、2、3、4)^[7]。Notch 信号通路被配体激活后释放 Notch 胞内段,进入细胞核激活 Notch 下游靶基因。人体中只有 Notch1 和 Notch4 在血管内皮表达,研究表明敲除 Notch1 会导致缺少血管重塑必需的原始血管丛^[8],其在后天血管形成中起重要作用^[9]。而 VEGF 作为 Notch 信号通路的上游启动因子共同参与了血管形成过程^[10]。本实验拟探究天然水蛭素是否通过 VEGF-Notch 信号通路,发挥促人微血管内皮细胞 (human microvascular endothelial cells, HMVECs) 增殖和血管再生的作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

HMVECs 购自北京北纳创联生物技术研究院。天然水蛭素 (南宁市净雪皇生物工程有限公司); Matrigel 基质胶 (Corning 公司, 美国); VEGF 抗体、Notch1 抗体 (Abcam 公司, 英国); HDMEM 培养液、FBS (Thermo Fisher 公司, 美国); 细胞计数试剂盒 8 (cell counting kit 8, CCK-8; Dojindo 公司, 日本)。

血管生成载玻片 (Ibidi 公司, 德国); 超净工作台、细胞培养箱 (Thermo Fisher 公司, 美国); 低温高速离心机 (Eppendorf 公司, 美国); 倒置相差显微镜 (Leica 公司, 德国); 37℃ 温水浴箱 (宁波新芝生物科技股份有限公司); 酶标仪 (Synergy 公司, 美国); 倒置荧光显微镜 (Olympus 公司, 日本)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞三维培养模型制备及分组 取 Matrigel 基质胶 4℃ 过夜后,转移至血管生成载玻片,每孔 10 μ L,置于 37℃ 培养箱 20 min,使液态基质胶凝固。取 HMVECs 以胰蛋白酶消化后,采用含 10%FBS 的 DMEM 培养基制成密度为 2×10^5 个/mL 的细胞悬液,并充分混匀;将已成胶的血管生成载玻片置于冰上,每孔接种 50 μ L 细胞悬液后,置于 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养 24 h,制备细胞三维培养模型,倒置相差显微镜下观察细胞成管情况。

取细胞三维培养模型,随机分为不同浓度天然水蛭素培养组 (1、4、7 ATU/mL 组) 以及单纯含 10%FBS 的 DMEM 培养基培养组 (对照组)。各组细胞三维培养模型加入对应培养基后,置于 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养,于相应时间点取标本进行观察。

1.2.2 CCK-8 细胞增殖实验 培养 24、48、72 h 后,各组取 6 个复孔分别加入 5 μ L CCK-8 溶液,继续培养 2 h 后,用酶标仪测定 450 nm 处吸光度 (A) 值。以无细胞的单纯培养基作为空白对照。实验重复 3 次。

1.2.3 细胞成管实验 培养 24 h 后,各组取 6 个复孔,倒置相差显微镜下观察细胞成管情况,并应用 Image J 软件计数成管数量。

1.2.4 免疫荧光染色测定 VEGF 和 Notch1 表达 培养 24 h 后,各组取 6 个复孔,细胞回收液收集细胞并接种至细胞爬片。细胞爬片用 PBS 浸洗 3 次,每次 3 min; 4% 多聚甲醛固定 15 min, PBS 浸洗;

0.5%TritonX-100 室温通透 20 min。滴加正常山羊血清封闭后,滴加稀释的一抗(VEGF、Notch1)、4℃ 过夜;滴加荧光二抗,1 h 后 PBST 洗 2 次、每次 2 min;滴加 DAPI 复染,用含抗荧光淬灭剂的封片液封片。最后,置于荧光显微镜下观察,呈绿色荧光为阳性染色细胞。

1.3 统计学方法

采用 SPSS25.0 统计软件进行分析。数据以均数±标准差表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 检验;检验水准 $\alpha=0.05$

2 结果

2.1 细胞三维培养模型构建观察

HMVECs 接种至基质胶三维培养至 24 h 时,细胞基本形成血管腔隙结构,形态规则,成管情况较好。见图 1。

2.2 CCK-8 细胞增殖实验

各时间点,1、4 ATU/mL 组 A 值均高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),提示该浓度天然水蛭素促进细胞增殖。其中,24 h 时 4 ATU/mL 组 A 值高于 1 ATU/mL 组,差异有统计学意义($P<0.05$);而 48、72 h 时两组 A 值比较差异无统计学意义($P>0.05$)。各时间点,7 ATU/mL 组 A 值显著低于其他 3 组,组间差异均有统计学意义($P<0.05$),提示该浓度天然水蛭素抑制细胞增殖。见图 2。

2.3 细胞成管实验

培养 24 h,对照组及 1、4、7 ATU/mL 组成管数量分别为(3.33±0.57)、(5.66±1.52)、(9.33±1.15)、(3.00±1.00)个。1、4 ATU/mL 组成管数较对照组及 7 ATU/mL 组明显增多,4 ATU/mL 组多于 1 ATU/mL 组,差异有统计学意义($P<0.05$)。而 7 ATU/mL 组与对照组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见图 3。

2.4 细胞 VEGF 和 Notch1 表达测定

荧光染色检测示,对照组及 1、4、7 ATU/mL 组 Notch1 表达量分别为 181.33±6.65、183.33±7.50、263.00±7.93、141.00±8.88。与对照组比较,1、4 ATU/mL 组 Notch1 表达量增高,7 ATU/mL 组降低;其中 4、7 ATU/mL 组与对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$),1 ATU/mL 组与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$);1、4、7 ATU/mL 组间比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见图 4。

对照组及 1、4、7 ATU/mL 组 VEGF 表达量分别为 88.60±5.50、184.00±11.53、283.33±16.16、

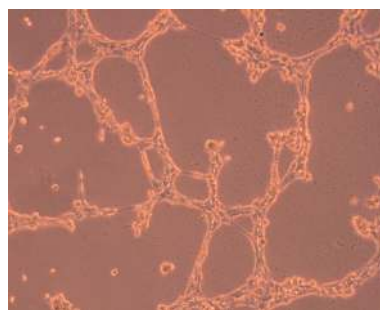


图 1 三维培养 24 h 后倒置相差显微镜下观察 HMVECs ($\times 200$)

Fig.1 HMVECs observation by inverted phase contrast microscope at 24 hours after three-dimensional culture ($\times 200$)

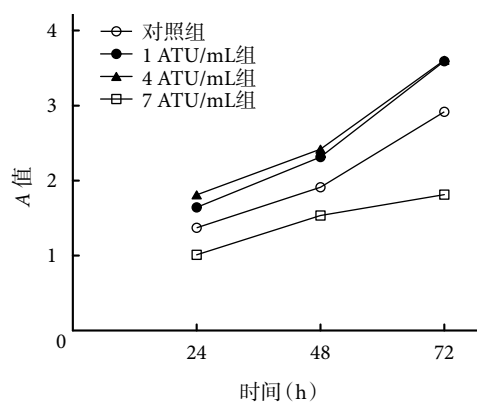


图 2 CCK-8 检测 HMVECs 生长曲线

Fig.2 The growth curve of HMVECs by CCK-8

176.33±9.71。1、4、7 ATU/mL 组 VEGF 表达量均较对照组增高,差异有统计学意义($P<0.05$);4 ATU/mL 组高于 1、7 ATU/mL 组,差异均有统计学意义($P<0.05$);而 1、7 ATU/mL 组间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见图 5。

3 讨论

国内外研究已证实,水蛭素可以改善动物微循环^[11-12],但其改善血运的机制尚不清楚。1992 年 Donayre 等^[13]的研究证实水蛭素抗凝作用远优于肝素,其作用不依赖凝血酶Ⅲ,可以直接与凝血酶结合,特异性强。而凝血酶有致炎作用,Huang 等^[14]研究发现 EGFR 是凝血酶导致炎症的重要调节点。近年在肿瘤学领域,Turpin 等^[15]和 Xu 等^[16]发现凝血酶具有通过炎性反应促进肿瘤生长的作用,因此反向分析水蛭素可能是通过拮抗凝血酶抑制各种炎性因子。结合国内外文献和本课题组前期研究结果,我们分析水蛭素除了通过拮抗凝血酶起到抗炎作用外,可能还具有直接促进微血管再生的作用。

本课题组既往研究主要采用鼠皮瓣淤血模型,

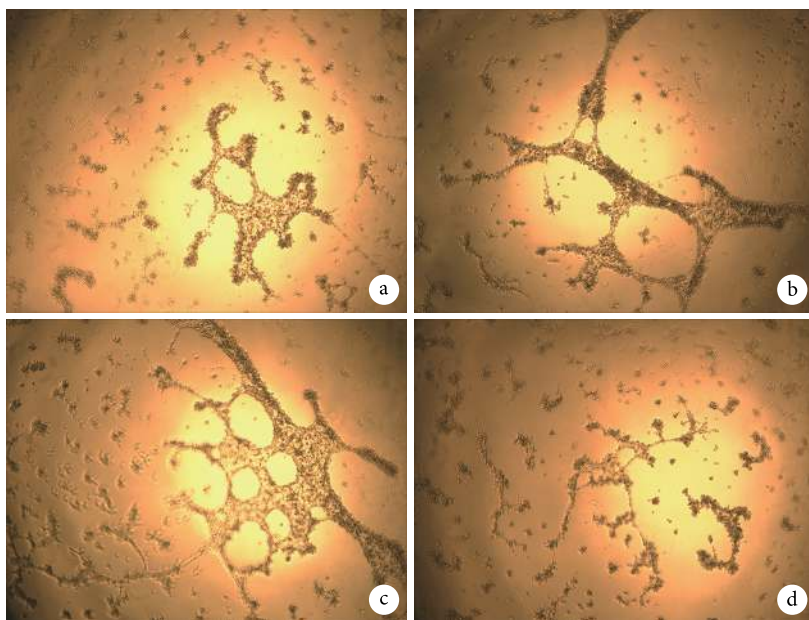


图3 各组细胞成管实验观察 (倒置相差显微镜×100) a. 对照组; b. 1 ATU/mL 组; c. 4 ATU/mL 组; d. 7 ATU/mL 组

Fig.3 The tube formation observations of different groups (Inverted phase contrast microscope×100) a. Control group; b. 1 ATU/mL group; c. 4 ATU/mL group; d. 7 ATU/mL group

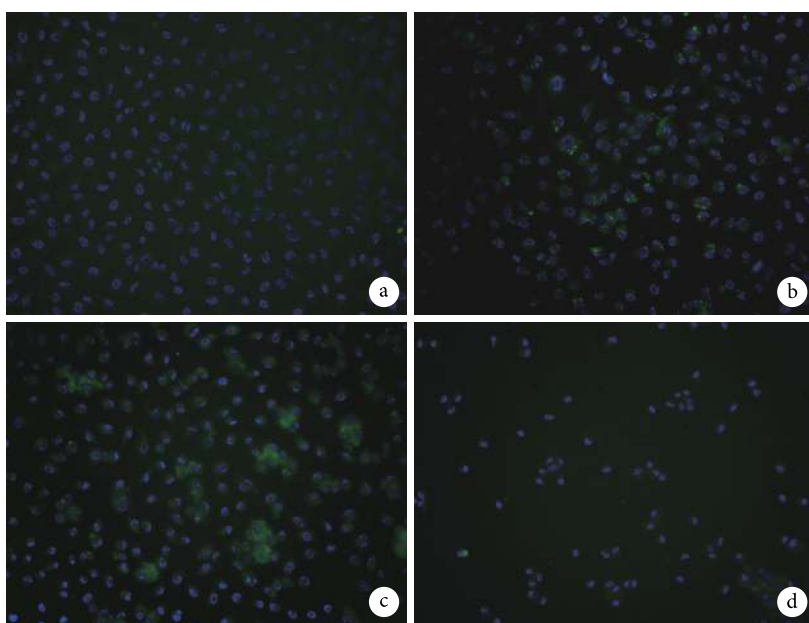


图4 各组 Notch1 免疫荧光染色观察 (倒置荧光显微镜×200) a. 对照组; b. 1 ATU/mL 组; c. 4 ATU/mL 组; d. 7 ATU/mL 组

Fig.4 The Notch1 expressions of different groups by immunofluorescence staining (Inverted fluorescence microscope×200) a. Control group; b. 1 ATU/mL group; c. 4 ATU/mL group; d. 7 ATU/mL group

本次改用细胞三维培养技术。主要因为,传统单层培养细胞在体外环境会逐渐丧失原有性状,不能产生体内细胞外基质屏障,生长特性与体内差异较大^[17]。而动物实验虽在体内进行,但由于体内多种因素制约以及体内和外界环境相互影响,不能观察中间细胞生长过程,其为研究重点关注内容。而细胞三维培养技术能模拟人体内微环境,培养细胞呈

立体生长,更接近于人体内自然生长环境^[18],填补了单层细胞培养和动物实验的不足^[19]。近年来,国内外一些研究者已通过各种细胞三维培养模型来研究人类疾病的发生发展规律^[20]。

VEGF-Notch 信号通路是经典的促血管生成分子通路,可以使人多功能干细胞分化成 HMVECs^[21]。本实验采用细胞三维培养模型,通过细胞增殖实

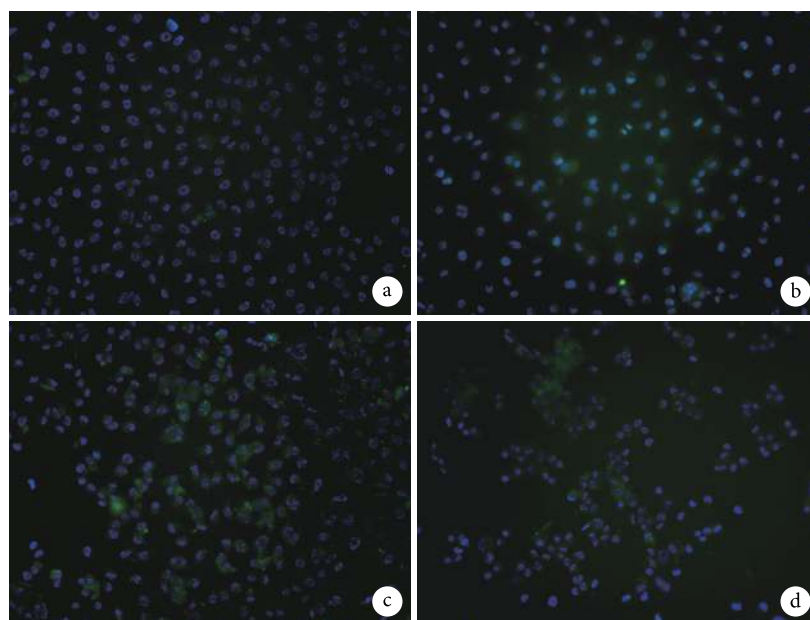


图5 各组 VEGF 免疫荧光染色观察 (倒置荧光显微镜×200) a. 对照组; b. 1 ATU/mL 组; c. 4 ATU/mL 组; d. 7 ATU/mL 组

Fig.5 The VEGF expressions of different groups by immunofluorescence staining (Inverted fluorescence microscope×200) a. Control group; b. 1 ATU/mL group; c. 4 ATU/mL group; d. 7 ATU/mL group

验、成管实验和免疫荧光染色直接测定水蛭素作用下 HMVECs 的 VEGF、Notch1 表达情况,结果提示天然水蛭素可能通过上调 VEGF-Notch 信号通路,促进细胞增殖和微血管形成。同时,我们也观察到这种促进作用仅在 1、4 ATU/mL 浓度时明显。随着药物浓度的增加,VEGF-Notch 信号通路表达量开始下降并逐渐转向抑制,且高浓度水蛭素明显抑制细胞增长,分析可能与高浓度水蛭素开始表现抗炎作用有关。当水蛭素表现抗炎作用抑制各种炎症因子释放时,也抑制了促进细胞增殖的 VEGF、Notch1 等再生因子的作用。

免疫荧光染色观察发现 3 个浓度的天然水蛭素均能促进 HMVECs 分泌 VEGF。但是仅 4 ATU/mL 浓度天然水蛭素能促进 HMVECs 分泌 Notch1, 1 ATU/mL 浓度时促进作用不明显,而浓度为 7 ATU/mL 时表现为抑制作用。我们分析 VEGF 是 Notch1 的上游因子^[10],所以低浓度天然水蛭素作用时,VEGF 受体敏感性较高,开始释放 VEGF;当浓度达 4 ATU/mL 时,大量释放的 VEGF 刺激下游 Notch1 受体释放 Notch1。而浓度为 7 ATU/mL 时,天然水蛭素主要表现为抗炎作用,VEGF 受体开始关闭,虽然细胞中还残存大量 VEGF,但不能达到下游 Notch1 受体的阈值,导致下游 Notch1 受体关闭,进而 Notch1 表达水平下降。

综上所述,天然水蛭素浓度为 4 ATU/mL 时,可能通过 VEGF-Notch 信号通路促进 HMVECs 增殖

及血管生成;而浓度为 7 ATU/mL 时则主要通过拮抗凝血酶和抗炎改善微循环,对 HMVECs 的增殖和微血管生成起抑制作用。但天然水蛭素通过 VEGF-Notch 信号通路促进血管生成的作用机制仍不明确;VEGF-Notch 信号通路与其他细胞增殖通路的是否存在交互作用,也需进一步研究探讨。

参考文献

- 1 张和韩,王丽萍.水蛭素的研究进展. *中国中西医结合肾病杂志*, 2013, 14(1): 76-78.
- 2 毛全高.水蛭素剂型研究进展. *安徽医药*, 2015, 19(12): 2250-2254.
- 3 郭应信,殷国前,李佳荃,等.天然、重组水蛭素对随意皮瓣淤血模型血管内皮细胞生长因子的影响. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15(7): 1210-1214.
- 4 郭应信,殷国前,李佳荃.天然与重组水蛭素对大鼠随意皮瓣淤血模型超氧化物歧化酶、丙二醛、内皮素变化的影响. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15(24): 4453-4456.
- 5 Pan XY, Peng L, Han ZQ, *et al.* Hirudin promotes angiogenesis by modulating the cross-talk between p38 MAPK and ERK in rat ischemic skin flap tissue. *Tissue Cell*, 2015, 47(3): 301-310.
- 6 Pitulescu ME, Schmidt I, Giaimo BD, *et al.* Dll4 and Notch signalling couples sprouting angiogenesis and artery formation. *Nature Cell Biology*, 2017, 19(8): 915-927.
- 7 Kovall RA, Gebelein B, Sprinzak D, *et al.* The canonical notch signaling pathway: structural and biochemical insights into shape, sugar, and force. *Dev Cell*, 2017, 41(3): 228-241.
- 8 Lv S, Cheng G, Zhou Y, *et al.* Thymosin beta4 induces angiogenesis through Notch signaling in endothelial cells. *Mol Cell Biochem*, 2013, 381(1-2): 283-290.
- 9 Sainson RC, Harris AL. Regulation of angiogenesis by homotypic

- and heterotypic notch signalling in endothelial cells and pericytes: from basic research to potential therapies. *Angiogenesis*, 2008, 11(1): 41-51.
- 10 Wen Z, Shen Y, Berry G, *et al.* The microvascular niche instructs T cells in large vessel vasculitis via the VEGF-Jagged1-Notch pathway. *Sci Transl Med*, 2017, 9(399). doi: 10.1126/scitranslmed.aal3322.
- 11 Peng L, Pan X, Yin G. Natural hirudin increases rat flap viability by anti-inflammation via PARs/p38/NF- κ B pathway. *BioMed Research International*, 2015, 2015(12): 1-7.
- 12 Fichter AM, Ritschl LM, Robitzky LK, *et al.* Impact of different antithrombotics on the microcirculation and viability of perforator-based ischaemic skin flaps in a small animal model. *Scientific Reports*, 2016, 6(1). doi: 10.1038/srep35833.
- 13 Donayre CE, Ouriel K, Rhee RY, *et al.* Future alternatives to heparin: low-molecular-weight heparin and hirudin. *J Vasc Surg*, 1992, 15(4): 675-682.
- 14 Huang B, Chen T, Bau D, *et al.* EGFR is a pivotal regulator of thrombin-mediated inflammation in primary human nucleus pulposus culture. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 1-15.
- 15 Turpin B, Miller W, Rosenfeldt L, *et al.* Thrombin drives tumorigenesis in colitis-associated colon cancer. *Cancer Res*, 2014, 74(11): 3020-3030.
- 16 Xu Z, Zhu L, Yao M, *et al.* PTEN plays an important role in thrombin-mediated lung cancer cell functions. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 459170.
- 17 任荣梅, 白怀. 血管生成三维培养模型的研究进展. *医学综述*, 2015, 21(16): 2881-2884.
- 18 滕伟, 郭志坤. 细胞三维培养的研究进展. *医学综述*, 2008, 14(12): 1767-1770.
- 19 赵燕娜, 许健, 邓同乐. 三维细胞培养技术在再生医学研究中的应用. *科技通报*, 2011, 27(4): 531-535.
- 20 Ganesan MK, Finsterwalder R, Leb H, *et al.* Three-dimensional coculture model to analyze the cross talk between endothelial and smooth muscle cells. *Tissue Eng Part C: Methods*, 2017, 23(1): 38-49.
- 21 Sahara M, Hansson EM, Wernet O, *et al.* Manipulation of a VEGF-Notch signaling circuit drives formation of functional vascular endothelial progenitors from human pluripotent stem cells. *Cell Res*, 2014, 24(7): 820-841.

收稿日期: 2018-06-11 修回日期: 2018-10-22

本文编辑: 刘丹